中国生态农业学报 2016 年 10 月 第 24 卷 第 10 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Oct. 2016, 24(10): 1382−1390

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.160322

DMPP 增强碳酸氢铵防控辣椒疫病的效果与机制*

曹 云[1] 王光飞[1] 郭德杰[1] 马 艳[1**] 罗德旭[2] 孙玉东[2] 汪国莲[2]

(1. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所 南京 210014; 2. 淮安市农业科学院 淮安 223001)

摘 要 为增强氨杀灭土壤病原微生物、防控作物土传病害的效果，采用室内培养和盆栽试验的方法，研究了硝化抑制剂 DMPP 和(或)碳酸氢铵预处理潮土 15 d，对土壤理化性质和土壤细菌、真菌、氨氧化菌、辣椒疫霉菌数量的影响以及对辣椒疫病的防效，并对辣椒疫病的发病率与土壤理化及微生物学性状进行相关性分析，为开发新的防控辣椒疫病的技术提供依据。结果表明，施加 DMPP 的土壤铵态氮含量显著高于对照，而土壤 pH、硝态氮和亚硝态氮含量显著低于对照。碳酸氢铵和 DMPP 配合施用处理土壤 15 d，土壤细菌 *amoA* 基因拷贝数和辣椒疫霉菌 ITS 基因拷贝数分别降低 34.9%($P>0.05$)和 93.8%($P<0.05$)；土壤 16S rRNA 基因拷贝数比未添加 DMPP 处理高出 54.7%($P<0.05$); DMPP 对土壤氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数无显著影响。栽植辣椒 28 d 后，DMPP 和碳酸氢铵配合施用处理的辣椒疫霉菌 *ITS* 基因拷贝数最低(2.1×10^5 copies·g^{-1})，其次为 DMPP (15.4×10^5 copies·g^{-1})；对照辣椒根际疫霉数量最高(37.1×10^5 copies·g^{-1})，分别比碳酸氢铵处理、DMPP 处理和 DMPP 和碳酸氢铵配合施用处理高 0.4 倍、1.4 倍和 16.8 倍。碳酸氢铵或 DMPP 处理过的土壤栽植辣椒 28 d 后，对照辣椒疫病发病率最高(95.00%)，仅施用碳酸氢铵处理发病率次之(85.00%)，DMPP 和碳酸氢铵配合施用处理的发病率最低(32.20%)，其防治效果达 66.11%。辣椒疫病的发生率与土壤电导率、硝态氮含量、疫霉菌数量正相关，与土壤 pH、铵态氮含量、细菌及真菌数量负相关。综上，碳酸氢铵和 DMPP 配合施用降低潮土氨氧化细菌的数量，从而增加铵态氮而降低硝态氮含量，提高了土壤 pH，进而降低土壤疫霉菌数量，因而能有效防控辣椒疫病。

关键词 硝化抑制剂 3, 4-二甲基吡唑磷酸 碳酸氢铵 辣椒 疫病 氨氧化菌
中图分类号: S436.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2016)10-1382-09

DMPP-enhanced control efficacy of chili pepper Phytophthora blight using ammonium bicarbonate: Action effects and mechanisms*

CAO Yun[1], WANG Guangfei[1], GUO Dejie[1], MA Yan[1**], LUO Dexu[2], SUN Yudong[2], WANG Guolian[2]

(1. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Huai'an Academy of Agricultural Sciences, Huai'an 223001, China)

Abstract Phytophthora blight of chili pepper, caused by oomycetes of *Phytophthora capsici*, has been reported to be a key limiting factor of chili pepper production worldwide. Increased public interest in protecting the environment and human health has prompted research in agronomic strategies that reduce the use of fungicides. Alternative control methods with high efficacy, low cost and limited environmental effect are high-priority research areas for sustainable agriculture. Under the same incubation conditions (soil moisture of 60% of field capacity, temperature of 25 ℃ and inoculation concentration of *P. capsici* of 500 CFU·g^{-1}), DMPP (1% applied pure N) and ammonium bicarbonate (AB) [100 mg(N)·kg^{-1}] were added tofluvo-aquic soil and incubated for 15 d. Soil without any addition of DMPP and/or AB was set as the control. After incubation, DMPP or

* 农业部公益性行业专项(201303023)和江苏省科技厅支撑计划(BE2014343)资助
** 通讯作者：马艳，主要研究方向为保护地土壤质量调控。E-mail: myjaas@sina.com
曹云，主要研究方向为农业废弃物资源化与新型肥料研制。E-mail: youngtsao66@126.com
收稿日期: 2016−04−06 接受日期: 2016−05−09

* This work was supported by the Special Fund for Agricultural Scientific Research in the Public Interest (201303023), and the Support Project of Science and Technology Department of Jiangsu Province of China (BE2014343).
** Corresponding author, E-mail: myjaas@sina.com
Received Apr. 6, 2016; accepted May 9, 2016

AB-treated soil was used to grow chili pepper in a pot experiment for 28 d. The effect of DMPP and AB application on disease incidence of Phytophthora blight of chili pepper was then compared. The soil physio-chemical and microbial responses (soil pH, electric conductivity, concentrations of different forms of nitrogen; numbers of total bacteria, fungi, *P. capsici* and ammonia-oxidizing bacteria) to the addition of DMPP and AB were determined. The relationship between Phytophthora blight disease incidence and soil phyiso-chemical and microbial characteristics was evaluated. The aim of the study was to investigate the control effects of DMPP-enhanced ammonium biocarbonate on Phytophthora blight of chili pepper and correlation with soil physio-chemical properties, and provided technological support for control of Phytophthora blight of chili pepper of greenhouse. The results suggested that compared with the control, the contents of soil ammonium nitrogen in DMPP and DMPP+AB treatments were higher, and the contents of nitrate and nitrite nitrogen significantly lower. The application of DMPP for 15 d decreased copied gene numbers of bacterial *amoA* and *P. capsici ITS* genes by 34.9% ($P > 0.05$) and 93.8% ($P < 0.05$), respectively. The copied 16S rRNA gene number increased by 54.7% ($P < 0.05$) compared with non-DMPP treatments. However, the copied numbers of fungal 18S rRNA gene and archaeal *amoA* gene were not significantly affected by DMPP. After incubation for 15 d, soil from each treatment was put into pots and ten chili pepper plants grown in each pot for 28 d. The *P. capsici* density was lowest in AB+DMPP (2.1×10^5 copies·g^{-1}) treatment, followed by DMPP (15.4×10^5 copies·g^{-1}). The control experiment had the highest number of pathogen (37.1×10^5 copies·g^{-1}), which was 0.4-fold, 1.4-fold and 16.8-fold higher than those of AB, DMPP and AB+DMPP, respectively. The results from the pot experiment showed that the control treatment had the highest disease incidence (95.00%), followed by AB treatment (85.00%) and AB+DMPP treatment had the lowest disease incidence (32.20%). The efficacy of Phytophthora blight disease control by AB+DMPP treatment was 66.11%. Disease incidence was positively correlated with soil electrical conductivity, nitrate content and *P. capsici* population, but negatively correlated with soil pH, ammonium content and bacterial and fungal populations. The above results suggested that the control of chili pepper Phytophthora blight by the combined application of DMPP and ammonium bicarbonate decreased the number of ammonia-oxidizing bacteria, which, in turn, increased ammonium content, but also decreased soil nitrate content. Thus *P. capsici* population reduced under high concentration of ammonium, which effectively controlled chili pepper Phytophthora blight.
Keywords Nitrification inhibitor; 3,4-dimethyl pyrazole phosphate (DMPP); Ammonium bicarbonate; Chili pepper; Phytophthora blight; Ammonia-oxidizing bacteria

辣椒疫病是由辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)引起的毁灭性土传病害，在世界范围内普遍发生。辣椒疫病在中国辣椒主产区发病面积占栽培面积的20%~30%，死苗率达 15.1%，发生严重的可减产七成，甚至绝收[1]。目前，该病主要以抗病育种、化学防治、农业防治和生物防治为主[2]，但这些方法的防治效果仍然具有一定的局限性，不能有效控制该病害的蔓延。因此，预防与控制该病害的发生已经成为设施辣椒(*Capsicum annuum*)生产亟待解决的重大难题。

氨在土壤中大量累积是高氮有机物料杀灭土壤病原微生物、防控作物土传病害的重要机制之一[3]，其作用效果与土壤中铵态氮的浓度与土壤 pH 有关。孙莉等[4]研究认为，当培养基 pH 介于 6.5~7.5 的范围内，铵对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑制效果随着 pH 的增加而增强。沈宗专等[5]利用碳酸氢铵产氨类物质特性，采用土壤熏蒸的方式有效降低了香蕉(*Musa nana*)园土壤中尖孢镰刀菌的数量，从而降低下茬香蕉枯萎病的发生。前期研究表明，当溶液中铵浓度增加到 500~1 500 mg·L^{-1} 时，对辣椒疫霉菌游动孢子萌发的抑制率可达 77.6%~95.4%[6]。与之相反，土壤硝态氮的浓度与辣椒疫霉菌数量在一定程度上呈正比[7]。可见，在一定 pH 下，增加土壤中铵态氮浓度，降低硝态氮浓度可以有效抑制辣椒疫霉菌的生长，从而抑制辣椒疫病的发生。

在通气良好的条件下，施入土壤中的铵态氮，除了部分发生氨挥发、生物吸收和土壤吸附等作用被消耗和滞留外，绝大部分在硝化微生物的作用下转化为硝态氮。研究证明，新型硝化抑制剂 3,5-二甲基吡唑(DMPP)具有比目前国内外研究应用较为广泛的硝化抑制剂双氰胺(DCD)更为显著的硝化抑制效果[8−9]。DMPP 能有效抑制土壤的硝化作用，延长 NH_4^+-N 在土壤中的保留时间，降低土壤淋出物中 NO_3^-的浓度，而土壤 NO_3^-含量与辣椒疫病的发生率呈正相关。将碳酸氢铵和 DMPP 配合施用，对土壤中辣椒疫霉菌的杀灭效果如何，以及土壤中除辣椒疫霉菌外的其他微生物对 DMPP 的响应如何目前尚不十分清楚。本研究通过在潮土中添加碳酸氢铵和(或)DMPP 进行 15 d 的室内培养试验，并用培养后的土壤进行盆栽防效试验，评价不同处理对辣椒疫病的防控效果及其与土壤理化性状变化的相关性，为开发防控保护地辣椒疫病新技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试辣椒品种为'苏椒 5 号'。供试土样采自江苏省淮安市青浦区蔬菜种植大棚 0~20 cm 耕层土壤，为潮土。土样经风干，剔除杂质并磨细后过 2 mm 筛备用。供试土壤的基本理化性质为：pH 8.54、有机质 19.90 $g\cdot kg^{-1}$，全氮 0.94 $g\cdot kg^{-1}$，硝态氮 133.12 $mg\cdot kg^{-1}$，铵态氮 5.06 $mg\cdot kg^{-1}$，速效磷 144.83 $mg\cdot kg^{-1}$，速效钾 141.12 $mg\cdot kg^{-1}$

供试碳酸氢铵和硝化抑制剂 3, 4-二甲基吡唑磷酸(DMPP)均为分析纯试剂。供试菌株辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* L.)由江苏省农业科学院农业资源与环境研究所提供。

1.2 试验设计

在风干过筛后的土壤中接种辣椒疫霉游动孢子液，使土壤中辣椒疫霉菌接种浓度为 500 $CFU\cdot g^{-1}$。设 4 个处理：1)土壤中不添加碳酸氢铵，也不添加 DMPP，对照(CK)；2)土壤中加入 DMPP(DMPP)；3)土壤中加入碳酸氢铵(AB)；4)土壤中加入碳酸氢铵和 DMPP(AB+DMPP)。DMPP 和碳酸氢铵溶于水后均匀喷洒在土壤上，碳酸氢铵的加入量为 100 $mg(N)\cdot kg^{-1}$(土)，DMPP 的加入量为施入总氮量的 1%。分别称取 14 kg 充分混匀的土壤装于塑料桶(底径×口径×高= 25 cm×34 cm×30 cm)中，调节土壤含水量为田间最大持水量(WHC)的 60%，风干土含水量按 3%计。每个处理 2 个重复(桶)。将土样放于 25 ℃培养箱中培养 15 d，封口，扎孔保证通气。培养期间，每隔 2 d 通过称量法补足培养过程中损失的水分。培养结束后将桶中土壤倒出并充分混合均匀后，分装在 10 个盆钵中。每个盆钵种植 6 叶期辣椒苗 1 株，移栽 28 d (即共培养 43 d)后统计辣椒发病率和病情指数。培养 0 d、2 d、4 d、8 d、15 d 后从桶中随机采取 3 个土样，移栽后 28 d(培养的 43 d)采集辣椒根际土壤，测定土壤 pH、电导率、含水量、硝态氮、亚硝态氮和铵态氮的含量，培养的 15 d 和 43 d 的土样同时测定细菌、真菌和辣椒疫霉菌、氨氧化细菌(AOB)、氨氧化古菌(AOA)的数量。

1.3 病情调查方法

辣椒幼苗移栽后，每天观察辣椒生长情况。移苗 9 d 后发现病原菌对照处理开始萎蔫发病,之后每天调查记录各处理辣椒疫病发病情况，至试验结束时，计算发病率和病情指数。辣椒疫病病情分级标准参照易图永等[10]的方法，稍作调整，如下：0 级，健康；1 级，茎基变黑，但植株不萎焉；2 级，茎基变黑 1~2 cm, 1/3 以下叶片萎焉偶脱落；3 级，茎基变黑 2 cm 以上, 2/3 以上叶片明显萎焉；4 级，植株全部枯死。

1.4 土壤总 DNA 的提取与荧光定量 PCR 分析

将采集晾干的土样研碎并过筛(1 mm)，装入聚乙烯袋保存在−70 ℃冰箱中用于 DNA 提取。土壤 DNA 的提取采用 FastDNA® Spin soil kit (MP Biomedicals, Solon, OH)试剂盒，提取方法参照试剂盒说明书。

土壤中细菌 16S rDNA 上游引物 EUB338f (5′-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3′)、下游引物 907r (5′-CCGTCAATTCMTTTRAGTT-3′)；真菌 18S rDNA 上游引物 EUK309f (A 5′-CCGGAGAGGGAGCCTG-3′)、下游引物 EUK516r (5′-ACCAGACTTGCCCTCC-3′)。土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因上游引物 amoA1F (5′-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3′)、下游引物 amoA2R (5′-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3′)；氨氧化古菌 *amoA* 基因上游引物为 amoAF(5′-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3′)、下游引物 Arch-amoAR(GCGGCCATCCATCTGTATGT)[11]；辣椒疫霉菌 *ITS* 上游引物 CAPFW(5′-TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC-3′)、下游引物 CAPRV1(5′-CCTCCACAACCAGCAACA-3′)[12]。荧光定量 PCR 扩增体系为：1X SYBR® Premix Ex TaqTM (2X)(Takara 宝生物工程有限公司)混合液 10 μL，上、下游引物各 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, ddH_2O 7 μL。反应程序：95 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 30 s，60 ℃退火延伸 34 s，40 个循环。每个样品设 3 个重复，以无菌水代替目标基因 DNA 为空白对照，定量 PCR 分析在 ABI 7500 Real-time PCR system 扩增仪上进行。

1.5 土壤常规理化性状的分析

土壤的铵态氮、亚硝态氮和硝态氮的质量浓度，采用 2 $mol\cdot L^{-1}$ KCl 溶液浸提–流动分析仪法。用 pH 计测定土壤 pH(水：土=2.5：1 浸提)，用电导率仪测定土壤电导率(水：土=2.5：1 浸提)[13]。

1.6 数据分析

病情指数计算公式为：

$$\text{病情指数}=\frac{\sum \text{各级病株数}\times\text{各级代表值}}{\text{调查总株数}\times\text{最高级代表值}}\times 100\% \quad (1)$$

$$\text{防治效果}=\frac{\text{对照发病率}-\text{处理发病率}}{\text{对照发病率}}\times 100\% \quad (2)$$

采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析，用 SigmaPlot 10.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对辣椒疫病的防治以及对辣椒疫霉菌的抑制效果

从图 1 可以看出，发病率最高的处理为 CK

(95.00%)，其次为碳酸氢铵(AB)处理(85.00%)和DMPP处理(60.00%)；AB+DMPP处理的发病率最低(32.20%)，防治效果66.11%。各处理病情指数的变化趋势与发病率一致，CK处理平均病情指数最高，其次为AB，而AB+DMPP处理病情指数最低(图1)。

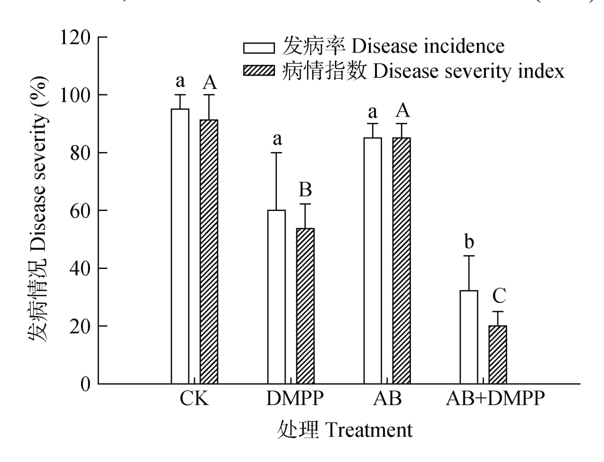


图 1　不同处理对辣椒疫病的发病率和病情指数的影响
Fig. 1　Effect of different treatments on chili pepper Phytophthora blight disease incidence and disease index

CK表示不施肥也不施用DMPP的对照，DMPP表示仅施用DMPP(施入总氮量的1%)，AB表示仅施用碳酸氢铵[加入量为100 mg(N)·kg^{-1}(土)]，AB+DMPP表示碳酸氢铵和DMPP同时施入。不同小写、大写字母分别表示发病率、病情指数处理间差异显著(P<0.05)，下同。CK is the control without DMPP and nitrogen; AB is treatment of ammonium bicarbonate, application rate is 100 mg(N)·kg^{-1}(soil); DMPP is treatment of DMPP, application rate is 1% of applied pure N; AB+DMPP is treatment of combined application of ammonium bicarbonate [100 mg(N)·kg^{-1}(soil)] and DMPP (1% of applied pure N). Different lowercases and uppercases indicate significant difference in disease incidence and disease index among treatments at 0.05 level, respectively. The same below.

荧光定量PCR对4个处理中辣椒疫霉定量结果(图2)表明，两个采样时期所有处理均能检测到荧光信号，土壤培养15 d(15 DAT)各疫霉的数量介于1.5×10^{5}~24.3×10^{5} copies·g^{-1}(土)，CK处理疫霉菌数量最多，其次为AB处理，AB+DMPP处理疫霉菌数量最少。辣椒移栽后28 d(即土壤处理43 d后，43 DAT)各处理疫霉菌数量均有不同程度的上升，AB处理疫霉菌数量增加1.1倍，但各处理疫霉菌趋势与15 DAT相似；4个处理的病原菌数量与疫病发病率呈现较好的对应关系：发病率最低的AB+DMPP处理，其疫霉数量最少(2.1×10^{5} copies·g^{-1})，显著低于其他各处理，其次为DMPP(15.4×10^{5} copies·g^{-1})，发病率最高的CK处理，辣椒根际疫霉数量最高(37.1×10^{5} copies·g^{-1})，分别比AB、DMPP和AB+DMPP处理高0.4倍、1.4倍和16.8倍。

2.2　不同处理对土壤氨氧化细菌、氨氧化古菌和总细菌、总真菌数量的影响

从图3可以看出，氨氧化细菌*amoA*基因拷贝数

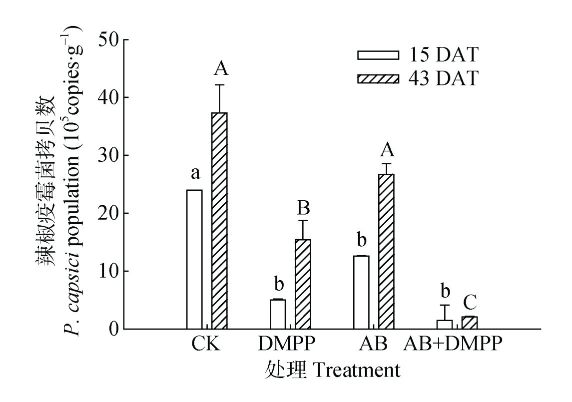


图 2　不同处理对辣椒疫霉菌数量的影响
Fig. 2　Effect of different treatments on *Phytophthora capsici* population in soil

不同大写字母表示土壤培养43 d(43 DAT)不同处理间差异显著，不同小写字母表示土壤培养15 d(15 DAT)不同处理间差异显著(P<0.05)，图3同。Different capital letters indicate significant difference among treatments at 43 days after treatment (43 DAT), and different lowercase letters indicate significant difference among treatments at 15 days after treatment (15 DAT) at 0.05 level. The same as the figure 3.

介于5×10^{7}~16.1×10^{8} copies·g^{-1}，且两个采样时期相比差异不大。AB处理氨氧化细菌*amoA*基因拷贝数最高，其次是CK和AB+DMPP处理。DMPP处理氨氧化细菌*amoA*基因拷贝数最低。DMPP显著降低了土壤氨氧化细菌*amoA*基因拷贝数，DMPP处理和AB+DMPP处理氨氧化细菌*amoA*基因拷贝数分别比CK和AB低84.7%~34.9%、69.5%~92.9%。古菌*amoA*基因拷贝数介于2.4×10^{7}~4.5×10^{8} copies·g^{-1}。DMPP对古菌*amoA*基因拷贝数的影响没有明显规律。细菌16S rRNA基因拷贝数介于1.09×10^{11}~7.36×10^{11} copies·g^{-1}，除AB+DMPP处理外，栽植辣椒增加了土壤中16S rRNA基因拷贝数，AB+DMPP处理和DMPP处理的土壤16S rRNA基因拷贝数平均值比未添加DMPP处理的高出54.7%。真菌18S rRNA基因拷贝数介于1.26×10^{7}~1.61×10^{8} copies·g^{-1}。除AB+DMPP处理外，栽植辣椒后真菌18S rRNA基因拷贝数增加了2.5~4.9倍。DMPP处理土壤15d后，对真菌18S rRNA基因拷贝数影响不显著，但栽植辣椒28d后，施加DMPP的处理真菌18S rRNA基因拷贝数比未施加的数量低55.6%~72.3%(图3)。

2.3　不同处理对土壤铵态氮、硝态氮、亚硝态氮含量的影响

各处理的土壤铵态氮含量随硝化作用的进行逐渐降低(图4)，但DMPP处理的下降速率显著低于CK。在培养的第15 d，CK和AB的土壤铵态氮浓度下降了69.6%和79.9%，而DMPP处理和AB+DMPP处理分别下降了47.2%和38.7%。整个培养期间，添加DMPP处理铵态氮含量均保持较高水平。同培养

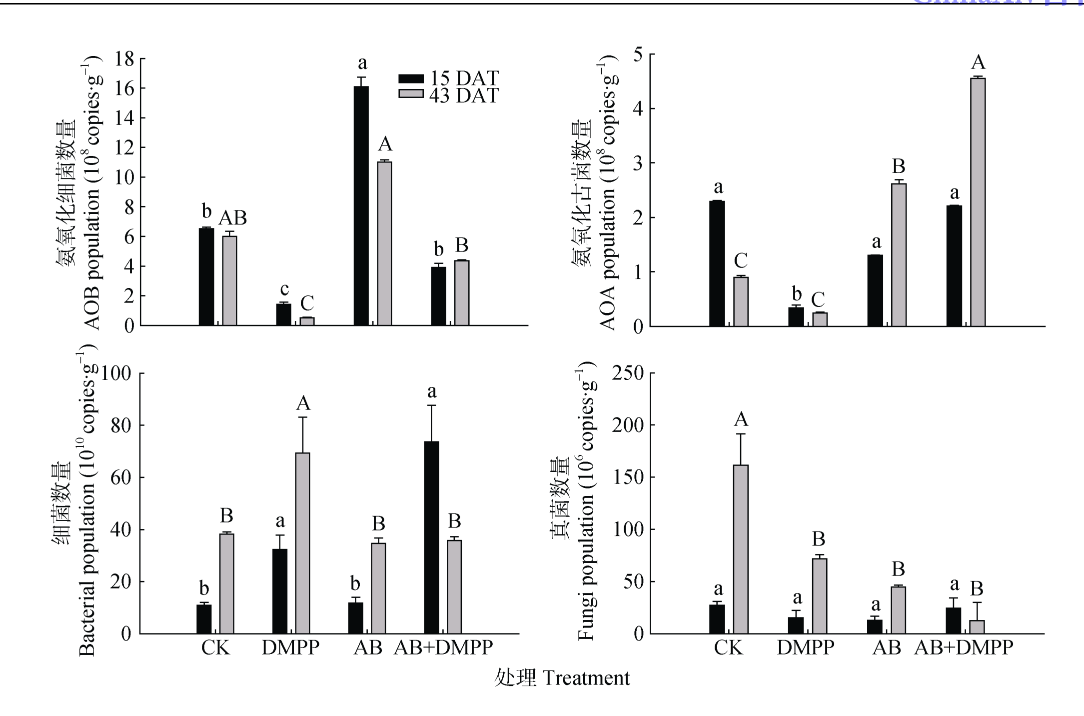


图 3 不同处理土壤氨氧化细菌、氨氧化古菌、细菌和真菌数量

Fig. 3 Abundance of soil AOB, AOA, total bacteria and total fungi under different treatments

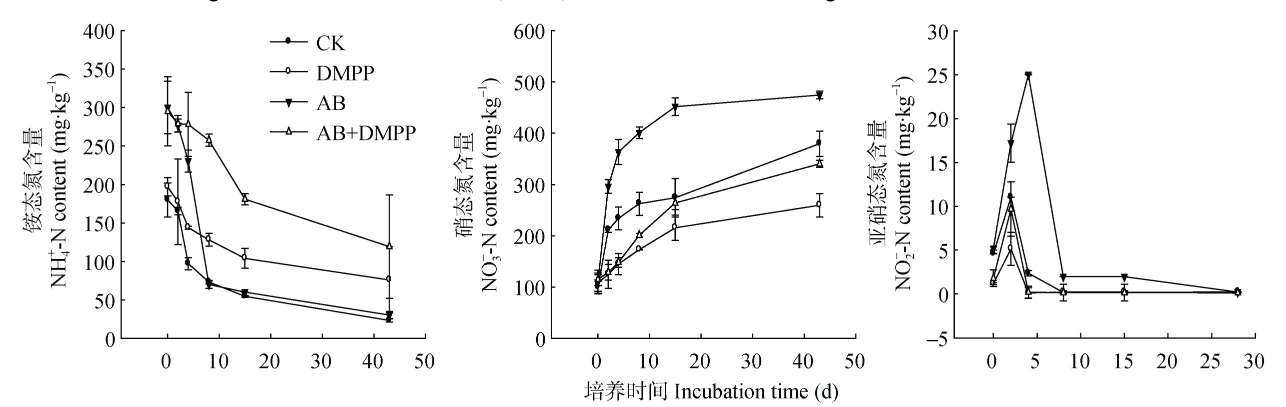


图 4 不同处理下土壤铵态氮、硝态氮、亚硝态氮含量变化的趋势

Fig. 4 Change trends of ammonium, nitrate and nitrite contents in soil under different treatments

时期相比，培养 8 d 后添加 DMPP 处理铵态氮含量显著高于未添加 DMPP 处理。

所有处理土壤硝态氮量随培养时间的推移逐渐升高(图 4)，但其土壤硝态氮含量在 AB 和 CK 中急速上升，而在 DMPP 和 AB+DMPP 处理中上升缓慢。盆栽试验结束时(培养的第 43 d), CK、AB 处理土壤中硝态氮含量达到峰值(379 mg·kg^{-1}、474 mg·kg^{-1})，较初始值分别上升了 279 mg·kg^{-1}、364 mg·kg^{-1}，DMPP、AB+DMPP 处理只分别增加了 151 mg·kg^{-1}、225 mg·kg^{-1}。整个培养期间, AB 处理硝态氮含量始终最高, DMPP 处理硝态氮含量始终最低。

亚硝态氮是硝化过程的中间产物。试验表明，AB 处理的土壤在培养的前 4 d 出现了较高浓度的亚硝态氮(图 4)，在第 4 d 达到峰值为 25 mg·kg^{-1}，而施加 DMPP 的各处理均能够显著抑制土壤亚硝态氮的产生($P<0.05$)，培养 7 d 后基本检测不到。

2.4 不同处理对土壤 pH 和电导率的影响

由图 5A 可知, AB 处理和 DMPP 处理 pH 在培养后第 2 d 上升至最高，分别为 8.78(AB)和 8.81 (DMPP)，AB+DMPP 处理的 pH 峰值出现在第 4 d (8.71)，而后各处理的 pH 都呈下降趋势(4~15 d)；与铵态氮的变化相似, AB 处理下降幅度最大, DMPP 和 AB+DMPP 处理 pH 的下降幅度小于其他处理。整个培养过程中，DMPP 和 AB+DMPP 处理土壤的 pH 始终保持在较高水平，但两处理间差异不显著。培养 8 d 后，AB 处理土壤 pH 最低。培养 15 d 后(即辣椒移栽后)，各处理土壤 pH 趋于稳定。

图 5B 显示，随着培养时间的延长，土壤电导率呈增长趋势，其中 AB 处理电导率值最大。与土壤 pH 值相反，培养 7 d 后，添加了 DMPP 的两个处理

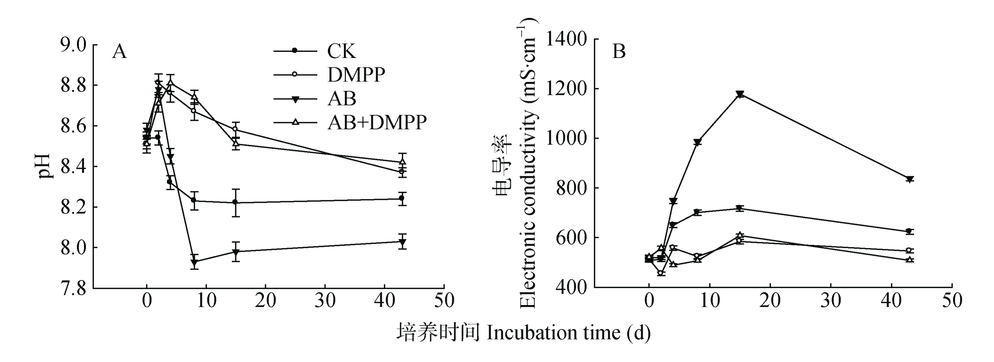


图 5　不同处理的土壤 pH(A)和电导率(B)变化趋势
Fig. 5　Change trends of pH (A) and EC (B) of soil under different treatments

(PC+DMPP、AB+DMPP)土壤电导率始终低于未添加 DMPP 的处理。

2.5　土壤理化性质和微生物指标的主成分分析

主成分分析结果显示(图 6), 第 1 主成分、第 2 主成分分别解释了样本中 68.2%、15.7%的变异。第 1 主成分将是否添加 DMPP 的处理区分开, 添加 DMPP 的两个处理: DMPP 和 AB+DMPP 排在第 1 主成分的正轴, 未添加 DMPP 的 CK 和 AB 处理排在第 1 主成分的负轴, 说明 DMPP 对土壤肥力和微生物数量影响很大。第 2 主成分将是否添加碳酸氢铵的处理区分开, AB 以及 AB+DMPP 排在第 2 主成分的正轴, CK 以及 DMPP 排在第 2 主成分的负轴。辣椒疫病的发生率 DI 与土壤 pH、铵态氮浓度、氨氧化古菌、细菌和真菌数量负相关, 与土壤 EC、硝态氮及亚硝态氮含量、氨氧化细菌及疫霉菌数量正相关。土壤中疫霉菌的数量与铵态氮浓度呈负相关, 与硝态氮及亚硝态氮浓度呈正相关。土壤肥力指标之间也有明显相关关系: 如 EC 与铵态氮、硝态氮浓度之间, pH 与 EC、铵态氮、硝态氮浓度之间相关性较高。

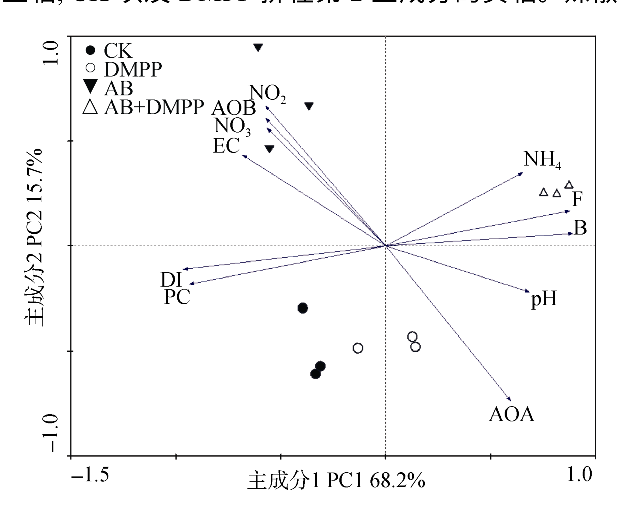


图 6　各处理辣椒疫病发生率与土壤理化性状及微生物数量的主成分分析
Fig. 6　Principal component analysis (PCA) of the disease incidence of chili pepper hytophthora blight, populations of different microbia and soil chemical properties under different treatments at 15 days after treatment

DI 表示发病率, AOA、AOB 分别表示氨氧化古菌、氨氧化细菌数量, F、B、PC 分别表示总真菌、总细菌、辣椒疫霉菌数量, NH_4、NO_2、NO_3 分别表示铵态氮、亚硝态氮、硝态氮含量。DI represents disease incidence; AOA and AOB represent abundances of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria; F, B and PC represent abundances of total fungi, total bacteria and *Phytophthora capsici*, respectively; NH_4, NO_2 and NO_3 represent ammonium, nitrite and nitrate concentrations.

3　讨论

近年来, 由于不合理的耕作管理引起的土壤连作障碍问题逐渐受到人们的关注。土壤连作障碍表现为土壤养分供应比例失调(如硝态氮的累积)、土壤酸化、次生盐碱化、微生物量和微生物活性降低、有害生物(如病原菌)的增加等[14–15]。疫霉是一种普遍存在的重要土传病原菌, 在世界范围内危害辣椒、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)等多种作物, 常给农作物生产带来毁灭性经济损失[1–2]。辣椒疫病的发病程度除受到植株健康状况、环境因子, 如土壤温度、湿度、养分状况, 耕作制度和栽培管理条件等影响外[16], 还取决于根际和土体土壤中的病原菌数量及遗传变异程度和土壤微生物区系[17–18]。在本试验中, 施用 DMPP 后, 辣椒疫病的发生率与土壤硝态氮含量、电导率、疫霉菌数量显著正相关, 而与土壤 pH、铵态氮含量、细菌及真菌数量显著负相关。采用碳酸氢铵结合 DMPP 处理土壤后 15 d, 土壤中的铵态氮含量较高, 硝态氮含量较低, 疫霉菌数量显著减少, 土壤中病原菌源菌基数越低, 后期病害发生率就越低[19–21]。

氨在土壤中大量累积是含氮有机物抑制土壤病原菌防控作物土传病害的重要机制之一[3]。Chun 和 Lockwood[22]研究认为, 土壤中 *P. cinnamomi* 和 *P. parasitica* 数量的下降与氨对土壤溶液中孢子囊的形成和萌发有关。病原菌与土壤溶液中的氨接触时间

越长，孢子囊萌发率越低[3]。铵抑制病原微生物的机理在于：氨化作用促使土壤 pH 在短时间内升高，pH 的升高使得土壤溶液中 NH_3 的浓度迅速升高，因此能有效杀灭病原菌[3,22–23]。DMPP 对土壤硝化过程的抑制作用表现在土壤铵态氮浓度的升高和硝态氮浓度的降低，这种作用在此培养试验取样的 4~15 d 表现显著，这与薛妍等[24]、石美等[25]的研究结果一致。本试验中，DMPP 处理土壤 15 d 对真菌数量影响不明显，但显著降低了土壤辣椒疫霉菌的数量，这与孙莉等[4]的研究结果即硝化抑制剂对尖孢镰刀菌生长没有影响不一致，其原因可能是辣椒疫霉病菌属于卵菌，其细胞壁的主要成分是纤维素；而尖孢镰刀菌是真菌中进化程度较高一类，其细胞壁主要成分是几丁质，DMPP 对辣椒疫霉菌的抑制效果可能与其的细胞壁成分有关，但确切的作用机理尚需进一步研究。

土壤硝化作用是在硝化微生物参与下完成的生物化学反应。硝化抑制是通过选择性的对土壤硝化微生物直接快速且强烈地抑制，来实现其硝化抑制作用的。Di 等[26]对新西兰高氮草地土壤的研究表明土壤中施加 DMPP 可显著抑制 AOB 的生长，改变其群落结构，但对 AOA 无显著影响。而 Zhang 等[27]得出 AOA 在强酸性土壤硝化作用中占据主导地位的结论。本研究结果表明, DMPP 显著降低了土壤中 AOB 的数量，而对 AOA 数量影响不大，这可能与土壤中起主导作用的氨氧化微生物类群有关。细菌是土壤微生物中数量最多的一个类群，约占土壤微生物总量的 70%~90%。本研究中 DMPP 处理虽然降低了氨氧化细菌的数量，但增加了土壤细菌总量，可能是因为氨氧化菌是细菌群落中参与氮素转化生理菌群，在细菌群落中所占的比例很小，且生长增殖速度缓慢，对土壤细菌总量的贡献不大。此外，DMPP 作为一种有机碳化合物，其本身及其在土壤中的降解产物可能为微生物提供了可利用的 C 源，从而促进了土壤微生物的增殖[28]；所以尽管本研究中 DMPP 处理土壤氨氧化菌数量显著降低，但土壤总细菌数量仍然比对照高。土壤真菌数量对 DMPP 响应不明显，这是因为与细菌相比，土壤真菌可能对低剂量 DMPP 反应不敏感[28]。

在整个培养期内，土壤的电导率与铵态氮含量负相关，而与硝态氮含量正相关，因为一部分铵态氮被吸附，另一部分还可进入黏土矿物的晶体中，成为固定态铵，而土壤胶体对硝态氮吸附能力较弱，因此硝态氮对土壤电导率的贡献较大[29]。各处理土壤 pH 和铵态氮的变化趋势相同，表现为先上升后下降，这主要与土壤中的氮素转化有关：碳酸氢铵施入土壤后，在适宜水分条件下会迅速水解转化使土壤 pH 上升，随后发生的硝化作用铵态氮氧化为硝态氮，此过程释放 H^+导致土壤 pH 下降。本研究中硝化抑制剂处理土壤 pH 显著高于不施用 DMPP 处理。这是由于硝化抑制剂施用后，土壤中较长时间保持较高的 NH_4^+-N 含量和较低的 NO_3^--N 含量，造成土壤 pH 的升高[29]，这更加有利于土壤溶液中游离氨浓度的提高，增强杀菌效果。

4 结论

在 DMPP 作用下，土壤氨氧化细菌(AOB)数量受到抑制，使得铵态氮浓度在较长时间内保持较高水平，而硝态氮含量显著下降，同时土壤 pH 上升，导致土壤中疫霉菌数量下降，辣椒疫病发生率显著下降。但由于铵对土壤病原微生物的杀灭作用受到土壤性质(质地、pH 等)的影响，因此利用该方法防控土传病害的土壤适宜性，以及针对不同病害特征的处理方式还有待进一步的研究。

参考文献 References

[1] 易图永，谢丙炎，张宝玺，等. 辣椒疫病防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 52–55
Yi T Y, Xie B Y, Zhang B X, et al. Progress of studies on controlling *Phytophthora capsici* of pepper crop[J]. China Vegetables, 2002(5): 52–55

[2] 王得元，常彩涛，王鸣，等. 辣椒抗疫病的遗传与育种[J]. 中国蔬菜, 1995(3): 50–53
Wang D Y, Chang C T, Wang M, et al. Genetics and breeding of peper tolerant to *Phytophthora capsici*[J]. China Vegetables, 1995(3): 50–53

[3] Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 2002, 92(3): 255–264

[4] 孙莉，宋松，邓旭辉，等. 碳酸氢铵抑制尖孢镰刀菌生长机制研究[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(2): 295–303
Sun L, Song S, Deng X H, et al. Inhibition mechanism of ammonium bicarbonate on *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(2): 295–303

[5] 沈宗专，钟书堂，赵建树，等. 氨水熏蒸对高发枯萎病蕉园土壤微生物区系及发病率的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2946–2953
Shen Z Z, Zhong S T, Zhao J S, et al. Effects of ammonia fumigation on soil microflora and banana production in an orchard with serious *Fusarium* wilt disease[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2946–2953

[6] 曹云，常志州，马艳，等. 猪粪沼液防治辣椒疫病机理研究——沼液中铵与腐殖酸的作用[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(9): 1119–1126
Cao Y, Chang Z Z, Ma Y, et al. Control mechanism of Phytophthora blight of chilli pepper by anaerobically digested

pig slurry — The roles of ammonium and humic acid in biogas slurry[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(9): 1119–1126

[7] 马艳, 常志州, 朱万宝, 等. 土壤硝态氮含量对辣椒疫病的影响及机理的初步研究[J]. 土壤肥料, 2004(2): 12–14
Ma Y, Chang Z Z, Zhu W B, et al. Studies on Phytophthora blight of chilli affected by NO_3-N content in soil[J]. Soils and Fertilizers, 2004(2): 12–14

[8] 茶正早, 林钊沐, 罗微. 德国新型硝化抑制剂 DMPP[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(12): 46–48
Cha Z Z, Lin Z M, Luo W. DMPP, a new nitrification inhibitor in German[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13(12): 46–48

[9] 石美, 梁东丽, 满楠, 等. 不同浓度 DMPP 和 DCD 对石灰性土壤中氮素转化的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(22): 4635–4642
Shi M, Liang D L, Man N, et al. Effects of different application rates of DMPP and DCD on nitrogen transformation in calcareous soil[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(22): 4635–4642

[10] 易图永, 张宝玺, 谢丙炎, 等. 辣椒疫病三种接种方法的比较[J]. 中国蔬菜, 2003(2): 16–18
Yi T Y, Zhang B X, Xie B Y, et al. Comparison of three inoculation methods for Phytophthora blight resistance[J]. China Vegetables, 2003(2): 16–18

[11] Yamada T, Miyauchi K, Ueda H, et al. Composting cattle dung wastes by using a hyperthermophilic pre-treatment process: Characterization by physicochemical and molecular biological analysis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(5): 408–415

[12] Silvar C, Duncan J M, Cooke D E L, et al. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon[J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 112(1): 43–52

[13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000
Bao S D. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000

[14] 吴凤芝, 孟立君, 王学征. 设施蔬菜轮作和连作土壤酶活性的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(4): 554–558
Wu F Z, Meng L J, Wang X Z. Soil enzyme activities in vegetable rotation and continuous cropping system of under shed protection[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2006, 12(4): 554–558

[15] Wu H S, Liu D Y, Ling N, et al. Influence of root exudates of watermelon on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Soil Science Society of America Journal, 2009, 73(4): 1150–1156

[16] 陈利锋, 徐敬友. 农业植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001
Chen L F, Xu J Y. Plant Pathology in Agriculture[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001

[17] 顾志光, 马艳, 安霞, 等. 麦秸淹水处理对连作土壤性状和辣椒疫病田间防控效果的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(9): 1762–1769
Gu Z G, Ma Y, An X, et al. Effects of wheat straw with flooding on soil properties and Phytophthora blight control in continuous chili pepper cropping field[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(9): 1762–1769

[18] 马艳, 胡安忆, 杨豪, 等. 菜粕生物熏蒸防控辣椒疫病[J]. 中国农业科学, 2013, 46(22): 4698–4706
Ma Y, Hu A Y, Yang H, et al. Effects of biofumigation with rapeseed meal on disease control of Phytophthora blight of chilli pepper[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(22): 4698–4706

[19] 何欣, 黄启为, 杨兴明, 等. 香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3809–3816
He X, Huang Q W, Yang X M, et al. Screening and identification of pathogen causing banana *Fusarium* wilt and the relationship between spore suspension concentration and the incidence rate[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(18): 3809–3816

[20] 董怀玉, 姜钰, 徐秀德, 等. 玉米丝黑穗病接种浓度与发病关系研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(5): 139–141
Dong H Y, Jiang Y, Xu X D, et al. Relationship study between incidence of *Sporisorium reilianum* of maize and inoculums density in soil[J]. Journal of Maize Sciences, 2007, 15(5): 139–141

[21] Hausbeck M K, Lamour K H. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges[J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1292–1303

[22] Chun D, Lockwood J L. Reductions of *Pythiumultimum*, *Thielaviopsis basicola*, and *Macrophomina phaseolina* populations in soil associated with ammonia generated from urea[J]. Plant Disease, 1985, 69(2): 154–158

[23] Sun L, Song S, Fu L, et al. Exploring a soil fumigation strategy based on ammonium bicarbonate to control *Fusarium* wilts of cucurbits[J]. Crop Protection, 2015, 70: 53–60

[24] 薛妍, 武志杰, 张丽莉, 等. 土壤含水量、pH 及有机质对 DMPP 硝化抑制效果的影响[J]. 应用生态学报, 2012, 23(10): 2663–2669
Xue Y, Wu Z J, Zhang L L, et al. Inhibitory effect of DMPP on soil nitrification as affected by soil moisture content, pH and organic matter[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(10): 2663–2669

[25] 石美, 张妹婷, 沈锋, 等. 石灰性土壤中不同硝化抑制剂的抑制效果及其对亚硝态氮累积的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 500–506
Shi M, Zhang M T, Shen F, et al. Effects of nitrification inhibitors on nitrification inhibition and nitrite accumulation in calcareous soil[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(3): 500–506

[26] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils[J]. Nature Geoscience, 2009, 2(9): 621–624

[27] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils[J]. The

ISME Journal, 2012, 6(5): 1032–1045
[28] 史云峰, 武志杰, 陈利军, 等. 3,5-二甲基吡唑磷酸盐(DMPZP)对土壤硝化作用的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(5): 1033–1037
Shi Y F, Wu Z J, Chen L J, et al. Effects of 3,5-dimethylpyrazole phosphate (DMPZP) on soil nitrification[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(5): 1033–1037
[29] 张妹婷, 石美, 梁东丽, 等. 不同硝化抑制剂对尿素转化的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(2): 178–184
Zhang M T, Shi M, Liang D L, et al. Effects of different nitrification inhibitors on urea transformation[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2011, 39(2): 178–184